

学校编码: 10384

学号: 24520121153111

分类号__密级__

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

大气颗粒物宫内暴露对大鼠胚胎心脏发育的影响

Prenatal Exposure to Airborne Particulate Matter on the
Development of Heart in Rat Fetus

龙燕

指导教师姓名: 洪新如 教授

专 业 名 称: 妇产科学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩日期: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2015 年 5 月

大气颗粒物宫内暴露对大鼠胚胎心脏发育的影响

龙燕

指导教师

洪新如
教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

英文缩略名词对照表	I
中文摘要	II
英文摘要	IV
绪论	1
第一部分 实验材料、方法与检测项目	4
第二部分 胚胎心脏发育的形态组织学观察	12
第三部分 胚胎心脏发育生物学指标检测	17
结果与讨论	40
参考文献	46
致谢	52
文献综述	53

Table of Contents

Abbreviations.....	I
Abstract in Chinese.....	II
Abstract in English.....	IV
Introduction.....	1
Chapter 1 Materials, method and test items.....	4
Chapter 2Embryonic cardiac morphology and histological obser vation.....	12
Chapter 3 Embryonic cardiac biology indicators detecting.....	17
Conclusion and Discussion.....	40
Reference.....	46
Thanks.....	52
Review.....	53

英文缩略名词对照表

英文缩写	英文全称	中文全称
BCA	Bicinchoninic acid	蛋白定量试剂盒
β-actin	Beta-actin	β-肌动蛋白
CHD	Congenital heart disease	先天性心脏病
CYP450	Cytochrome P450	细胞色素氧化酶 P450
EPA	The U.S. environmental protection agency	美国环保署
GATA-4	GATA binding protein4	GATA 结合蛋白 4
GSTM1	Glutathione S-transferase	谷胱甘肽硫转移酶
HE	Hematoxylin Eosin	苏木素—伊红
IL-1	Interleukin 1	白细胞介素—1
IUGR	Intrauterine growth retardation	宫内发育迟缓
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使 RNA
OD	Optical density	光密度
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons	有机多环芳烃
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
PCBs	Polychlorinated Biphenyls	多氯化联苯同源物
PCR	Polymerase chain reaction	多聚酶链反应
PM	Particulate matter	颗粒物
PM_{2.5}	Fine particulate matter	细颗粒物
PM₁₀	Inhalable particulate matter	可吸入颗粒物
Real-time PCR	Real-time fluorescence quantitative	实时荧光定量 PCR
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SPSS	Statistical package for the social sciences	社会科学统计软件
Tbx5	T box protein5	T 盒蛋白 5
UFPs	Ultrafine particles	超细颗粒物
Western Blotting	Western Blotting	蛋白印迹法

中文摘要

大气颗粒物 (Particulate Matter, PM) 是指悬浮在大气中的固体、液体颗粒物的总称。不同来源的颗粒物形成条件不同, 其粒径分布、化学组成也不同。目前国际公认的对人类健康危害较大且研究较多的大气颗粒污染物是 $PM_{2.5}$ (Fine Particulate Matter) 和 PM_{10} (Inhalable Particulate Matter)^[1]。越来越多的证据表明, PM 严重威胁着人体的健康, 更对孕妇及胎儿的发育产生不良影响, 导致出生缺陷儿增多, 使出生人口质量下降, 增加死亡率。因此, 胎儿生长过程是否受 PM 污染的影响, 国际上已重视多时。

国内外对 PM 诱导相关疾病发生的作用机制仍不够清楚, 尤其是 PM 对胎儿发育影响的实验研究较少。有研究认为^[2], PM 的毒性与其粒径相关, 粒径越小, 在空气中悬浮的稳定度越高, 总表面积越大, 吸附毒性物质和病原体的效能越高, 因此, 理论上有可能 $PM_{2.5}$ 比 PM_{10} 对于人体危害更大。但近年来另有研究显示: $PM_{2.5}$ 暴露与部分类型心脏畸形关联的结果为负相关^[3], 因此, 本课题以 SD 大鼠为实验对象, 通过对胚胎心脏的形态组织学观察及胚胎心脏发育生物学指标检测, 分析大气 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 的变化与心脏发育的相关性, 深入研究 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 对胚胎心脏发育影响的量效、时效关系及其作用机制, 了解二者的差别, 以期为进一步研究 PM 对胎儿心脏发育的影响提供理论依据。

研究内容和结果如下:

研究内容:

(1) 以 SD 大鼠为实验对象, 随机分为对照组、高、中、低剂量组, 除对照组外, 每一类组别均设两组, 每组 20 只;

(2) 以 PBS 为混悬剂, 将 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 分别配制成高 ($3.68\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、中 ($1.10\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、低 ($0.52\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 和高 ($2.21\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、中 ($0.55\mu\text{g}/\mu\text{l}$)、低 ($0.26\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 三个不同浓度的混悬液;

(3) 采用改良 PM 悬液气道内种植法[4]建立 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 暴露动物模型: 分别于对照组、 PM_{10} 和 $PM_{2.5}$ 高、中、低剂量组大鼠咽后壁滴注 $30\mu\text{L}$ 配制好的相应浓度的 $PM_{10}/PM_{2.5}$ 混悬液, 每三天处理一次, 总共染毒时间是孕前 7 周

至取材。染毒 7 周后，雌、雄性大鼠按 2:1 合笼，饲养环境安静，有良好的通风和空气过滤系统，室温控制在 21-24℃，湿度 55%左右，12h 光照/黑暗周期，给予充足的食物和水，每隔 1 天更换垫料。

(4) 分别于孕 13d、17d 在麻醉状态及无菌条件视体显微镜下剖取胎鼠心脏及剖取 0.5d 新生鼠心脏，苏木精-伊红染色（HE 染色）后在光镜及电镜下观察心脏组织形态结构和超微结构的变化。运用 Real-time PCR 和 Western blotting 从 mRNA 水平和蛋白水平检测相关因子表达量变化。

结果：

(1) 采用改良 PM 悬液气道内种植法，成功的制备了 SD 大鼠 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 暴露动物模型，为后续实验的开展铺下了基础。

(2) 光镜和电镜下对 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 暴露妊娠大鼠孕 13d、17d 胎鼠心脏及 0.5 天新生鼠心脏进行了组织切片观察，光镜下和电镜下 PM_{2.5} 和 PM₁₀ 高剂量暴露后胎鼠及新生鼠心肌细胞形态等均发生了不同情况的损害，中剂量、低剂量与对照组比较变化不是很大。

(3) 采用 Western blotting 法和 RT-PCR 法对 PM_{2.5} 和 PM₁₀ 暴露大鼠妊娠后第 13d、17d 及 0.5d 新生鼠胎心标本的 Nkx2-5 转录因子、Tbx5 转录因子、GATA-4 转录因子、IL-1 炎性因子、casepase-3 细胞凋亡因子生物学指标进行了检查，结果显示：PM_{2.5} 暴露条件下胎鼠心脏 IL-1、Casepase-3 基因蛋白及 mRNA 表达水平的改变较 PM₁₀ 暴露条件下变化大。提示 PM_{2.5} 暴露对心脏的损害作用可能强于 PM₁₀。

关键词：大气颗粒物（PM） PM_{2.5} PM₁₀ 胎鼠 心脏异常

Abstract

Airborne particulate matter (Particulate Matter, PM) is a generic term of solid, liquid particles which suspended in the atmosphere. Different sources of particle have different formation conditions, so the particle size distribution and chemical composition is also different. Recently, PM_{2.5} (Fine Particulate Matter) and PM₁₀ (Inhalable Particulate Matter) were internationally recognized the harmful atmospheric particulate pollutants to human health and were researched more and more^[1]. Most evidences show that PM threat to human health seriously and have a negative impact on maternal and fetal development lead to birth defects in children increasing, the quality of born population declining and the mortality rate increasing. Therefore, whether fetal growth is affected by PM pollution has begun to be concerned on the international for a long time.

No matter in China or abroad the function mechanism of the disease that PM induction related is still not clear enough, especially there are little research for PM effects on the fetal development. Toxicity associated with the size of PM, the smaller size of it, the higher stability in the air, adsorption of toxicant and pathogens is more effective^[2], therefore, it's possible that PM_{2.5} does more harm to the human body than PM₁₀ theoretically. But in recent years, some studies have shown^[3]: associated with some types of heart abnormalities, PM_{2.5} is negatively related to it. Therefore, this topic use SD rats as experimental subjects, through observing embryonic cardiac morphology and histological and detecting embryonic developmental biology indicators of heart disease, analysis of PM₁₀ and PM_{2.5}, the relationship of changes with newborns birth defects and cardiac malformations. Deeply study the relationship of PM₁₀ and PM_{2.5} impact on the development of embryonic cardiac's quantity, efficiency, timeliness and mechanism to learn the the difference of PM₁₀ and PM_{2.5}. In order to provide the theoretical basis to the country which can study PM affect fetal cardiac development, further.

Research contents and results as follows:

Research Contents:

(1) Using SD rats as experimental subjects, which were randomly divided into

control group, high group, medium group and low-dose group, except the control group, each of which groups were located two groups. Each groups have 20 rats.

(2) PBS as the solvent, PM_{10} and $PM_{2.5}$ are formulated into three different concentrations of suspension the high ($3.68\mu\text{g} / \mu\text{L}$), medium ($1.10\mu\text{g} / \mu\text{l}$), low ($0.52\mu\text{g} / \mu\text{l}$) and the high ($2.21\mu\text{g} / \mu\text{L}$), medium ($0.55\mu\text{g} / \mu\text{l}$), low ($0.26\mu\text{g} / \mu\text{l}$).

(3) Using the improved farming intratracheal suspension^[4] to establish PM_{10} and $PM_{2.5}$ exposure animal model. Dripping $30\mu\text{l}$ PBS solution and the corresponding concentrations PM_{10} or $PM_{2.5}$ suspension in the pharynx posterior wall of the control group, high, medium and low-dose group's rats. Handling once every three days, total exposure time is from 7 weeks before pregnancy to out. Female and male rats according to the proportion of 2:1 mating. Keeping the environment quiet, good ventilation and air filtration systems, temperature control at $21-24\text{ }^{\circ}\text{C}$, humidity around 55%, 12h light/dark cycle, giving adequate food and water, replacing the bedding once every day.

(4) At the anesthesia and sterile conditions, respectively, dissecting the heart of pregnant 13d, 17d and 0.5d newborn rat. After hematoxylin - eosin (HE staining) staining observed the heart tissue morphology changes under the light microscopy and electron microscopy, Using Real-time PCR and Western blotting from to mRNA and protein levels to detect the related factors expression vary.

Results:

(1) Using modified PM airway suspension planting method to establish $PM_{2.5}$ and PM_{10} exposure SD rat animal model, successfully. Lay the foundation for the subsequent experiments.

(2) Observing the heart tissue sections of pregnant 13d, 17d fetal cardiac and 0.5 days new born rats which were exposure under PM_{10} and $PM_{2.5}$ use the light and electron microscopy. Under the light microscopy and electron microscopy, high-dose exposure to PM_{10} and $PM_{2.5}$ the fetal and neonatal rats' myocardial cell and morphology have different damage, while compared with the control group the dose and low-dose change little.

(3) Examined PM_{10} and $PM_{2.5}$ exposure of rat pregnancy 13d, 17d and 0.5d newborn rat fetal specimens Nkx2-5 transcription factor, Tbx5 transcription factor, GATA -4 transcription factor, IL-1 biological indicators of inflammatory cytokines, casepase-3 apoptotic factor by Western blotting and RT-PCR method, the results show:

compared with PM₁₀, PM_{2.5} exposed fetal heart conditions, IL-1, Casepase- 3 gene protein and mRNA expression levels changed significantly. Tip PM_{2.5} exposure damage the cardiac likely stronger than PM₁₀.

Keywords: atmospheric particulate matter (PM); PM_{2.5}; PM₁₀; fetal; cardiac abnormalities

厦门大学博硕士论文摘要库

绪论

1 立项依据及研究意义

近年来,大气污染已成为影响人类健康的主要环境危害之一。曾有研究报道,与空气污染相关的心脏及呼吸系统疾病^[5]的危险性升高。越来越多的证据表明,大气污染严重威胁着人体健康,更对孕妇和胎儿的发育产生不良影响,由于各种原因,我国已成为世界上大气污染最严重的国家之一,而大气颗粒物(ambient particulate matter, PM)又是造成大气污染的重要原因之一^[6]。胎儿生长过程中是否受 PM 影响,国际上已重视多时。

PM 是指悬浮在大气中的固体、液体颗粒物的总称。PM 可吸附多环芳烃、重金属、炭黑等有害物质,甚至粘附病原体,通过人体的呼吸系统,伤害呼吸道、肺泡、血液和其他系统,通过氧化损伤进而引起炎症^[7]。由于不同来源的颗粒物形成条件不同,根据其粒径大小大致可分为:PM₁₀(thoracic particles)也称为可吸入颗粒物,是指空气动力学直径 $\leq 10\mu\text{m}$ 的颗粒;PM_{2.5}(fine particles)也称细粒子或细颗粒物,是指空气动力学直径 $> 0.1\mu\text{m}$ 且 $\leq 2.5\mu\text{m}$ 的颗粒;PM_{0.1}(ultrafine particles)也称超细颗粒物,是指空气动力学直径 $\leq 0.1\mu\text{m}$ 的颗粒。肯定的是 PM 只有被人体吸入附着于呼吸道后,才有可能对人体健康造成威胁,颗粒物的粒径与其物理化学性质和在呼吸道内沉积、滞留和清除相关,目前比较受关注的是 PM₁₀和 PM_{2.5}。PM₁₀经呼吸进入人体的上、下呼吸道;而 PM_{2.5}由于其粒径小,可直接进入肺泡并沉积,甚至可通过肺泡进入血液,因而对人体健康造成的危害远大于前者^[8],Churg 等^[9]研究发现沉积在下呼吸道的颗粒物 96%是 PM_{2.5}。通常颗粒物的粒径越小,就越易滞留在人体内,越易使毒性物质转移到身体的其他部位,加剧对人体健康的危害。有研究表明,由较细小颗粒组成的复杂结构集合体比由较大颗粒组成的简单结构集合体的表面积大,所以更容易吸附对人体健康有害的重金属和有机物,毒性更大,同时也使这些有毒物质在肺中更易溶解而被吸收入血,进而影响全身各系统包括生殖系统和胎儿循环系统^[10-11]。

PM 进入人体经各种方式进行代谢转化,可形成不同的代谢产物,有的可形成稳定的代谢产物排出体外;有的形成活性代谢产物,再经解毒排出体外;若人

体通过吸收、生物转化和排泄等代谢过程仍无法使 PM 进入体内的量降至允许的生物有效剂量及以下时,就会对机体产生潜在性危害或毒性作用,甚至可表现出疾病的早期症状,最后可能导致组织坏死,产生基因突变、致癌和致畸。近年来,不良妊娠结局的发生率明显增高,这些不良妊娠结局主要包括:低出生体重、早产、宫内发育迟缓(IUGR)、出生缺陷、死产等^[12-15]。虽然许多导致不良妊娠结局的原因还未明确,但是越来越多的证据显示,环境起了重要的作用。血胎屏障是机体固有免疫的内部屏障之一,可阻挡母体内有害物质进入胎儿体内,以往认为,与生命周期的其他阶段不同,胚胎由于受母体、子宫和胎盘屏障等的多重保护,大气污染对其发育过程的影响不大。近年来发现 PM 细小成分如 PM_{2.5} 能透过气血屏障直接进入血液循环,渗入到人体的深部组织;而 PM 较大组分如 PM₁₀ 等虽不能直接进入血液循环,却可通过炎症等局部效应而间接作用于全身。胎儿不成熟的器官系统对外界环境的易感性极高,发育阶段极其脆弱,易受各种不良因素的伤害,PM 可通过胎盘对胎儿生长造成直接损害或者间接损害母体的健康而影响胎儿^[16]。

心脏是胚胎发育期最早形成的器官,也是后来其他器官形成和正常发育的基础,先天性心脏病(Congenital heart disease, CHD)是一种常见的出生缺陷,是导致胎儿死亡的主要原因。心脏的形成是原始心源性细胞分化、迁移,多种细胞组合的一个精确、协调一致的过程。在心脏形成过程中,任何外界或内部的微小干扰均有可能导致 CHD。目前胎儿心血管畸形疾病发生率呈不断上升的趋势,这一趋势是否与 PM 相关,已开始受到重视。但是,查阅文献,国内外有关 PM 对人体作用的研究主要集中于成人神经系统、呼吸系统、免疫系统等,且近年来另有研究显示 PM_{2.5} 暴露与部分类型心脏畸形关联的结果为负相关,因此,本课题以 SD 大鼠为实验对象,探讨及比较大气 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 的变化与新生儿出生缺陷及心血管畸形的相关性,深入研究 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 对胚胎心血管发育影响甚至对个体后续发育可能造成的生物学效应的量效、时效关系及其作用机制,了解二者的差别,以期为国内进一步研究 PM 对胎儿心脏发育的影响提供理论依据和第一手实验资料,这具有重要的医学、社会和经济意义。

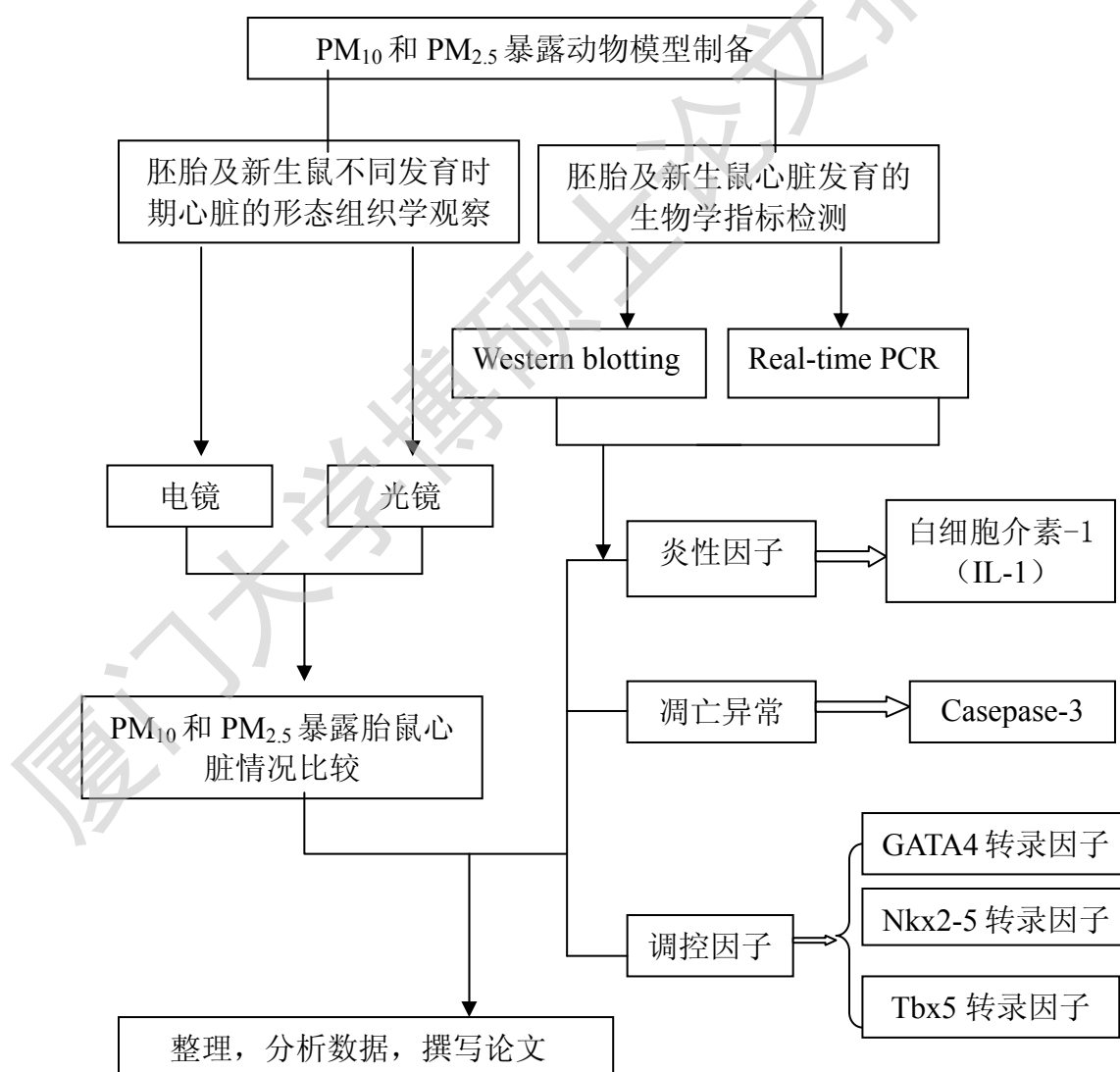
2 研究内容

以 SD 大鼠为实验对象,采用改良 PM 悬液气道内滴注法^[2]建立 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 暴露动物模型;

观察 PM₁₀ 和 PM_{2.5} 暴露模型动物胚胎不同发育时期心血管的形态组织学特点,比较心脏畸形发育情况;

检测染毒大鼠胚胎及新生鼠心脏发育的生物学指标,了解 PM 对心脏发育的影响。

3 研究技术路线



第一部分 实验材料、方法与检测项目

1 实验材料

1.1 PM 标准样品 (1649b Urban Dust-Organics; 2786 Urban Dust-Organics)

由美国俄亥俄州立大学公共卫生学院环境健康科学系 QH Sun 教授惠赠。

1.1.1 PM 的来源

PM 来源于华盛顿市区，使用特制的采样器采集，采集为期超过 12 个月，具有时间代表性。

1.1.2 暴露剂量的计算

PM 标准品 SRM1649b(平均空气动力学直径 $\approx 12.9\mu\text{m}$)和 SRM2786 ($2.5\mu\text{m} \leq \text{空气动力学直径} < 4\mu\text{m}$)，两者空气动力学直径相差较大，分别接近 PM_{10} 和 $\text{PM}_{2.5}$ 的空气动力学直径，可以代表 PM_{10} 和 $\text{PM}_{2.5}$ ，故本实验以 PM_{10} 和 $\text{PM}_{2.5}$ 为标准计算暴露剂量。

根据 2002 年美国环保署 (The U.S. Environmental Protection Agency, EPA) 的标准^[17]，大城市中 PM_{10} 的浓度范围应介于 $26\mu\text{g}/\text{m}^3$ — $534\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，我国 PM_{10} 浓度标准的日均值为 $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，年均值为 $70\mu\text{g}/\text{m}^3$ ^[18]。用最高剂量计算^[19]，假设一个健康成年人通气量为 $6\text{L}/\text{min}$ ，按照文献^[20]的呼吸道沉积模型（注：根据呼吸道沉积模型的模拟和计算，对性别、年龄、呼吸强度、呼吸道及肺部大小、颗粒的物理和化学性质等进行因地制宜的考量，本研究以文献^[20]的沉积分数为基础。）70%的粒子沉积于呼吸道中，那么 24h 的颗粒物总吸入量为： $3230\mu\text{g}$ ($6 \times 10^{-3} \text{m}^3/\text{min} \times 534\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 60 \times 24 \text{min} \times 70\% \approx 3230\mu\text{g}$)。人暴露于 $3239\mu\text{g}$ 剂量的颗粒物相当于成年 SD 大鼠（平均通气量约 $73\text{ml}/\text{min}$ ）暴露于超过 $39\mu\text{g}$ 剂量的颗粒物 ($73 \times 10^{-3} \times 10^{-3} \text{m}^3/\text{min} \times 534\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 60 \times 24 \text{min} \times 70\% \approx 39\mu\text{g}$)。

许多大城市中 PM_{10} 的浓度都高于此范围，年平均浓度达到 200 至 $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ ，峰浓度经常超过 $1000\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。根据我国实际情况，参考 PM 国家二级标准^[18]以比较相类似的条件下哪种 PM 更具毒性，从而对标准的制定提供参考，将 PM_{10} 高剂量定为 $36.8\mu\text{g}$ ($73 \times 10^{-3} \times 10^{-3} \text{m}^3/\text{min} \times 500\mu\text{g}/\text{m}^3 \times 60 \times 24 \text{min} \times 70\% \approx 36.8\mu\text{g}$)、中

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.